

タンパク質医薬品のナノ粒子構造体への効率的な封入方法の検討：タンパク質医薬品の血中安定性を向上させる方法として化学修飾を施さないナノ粒子構造体への封入は、有益な方法論であると判断された。リゾチームにつきポリイオンコンプレックスを用いてナノ粒子化した結果、PEG-P(Asp)およびPEG-P(Glu)共に、平均粒子径50 nm付近の粒子が得られ、PDIについては0.016 (PEG-P(Asp)) および 0.015 (PEG-P(Glu)) と、非常に粒度分布の狭い単分散な粒子が得られていることが示唆された。

リポソーム製剤の有効性に関わる品質特性に関する研究：各種脂質組成のリポソームを作製後、ドキシソルビシンを内包した。内包率の評価手法を構築し、測定したところ、いずれも90%を超えていたが、アシル鎖長が18未満の脂質から成るリポソーム、及びコレステロールを含有しないリポソームでは内包率が低かった。特にアシル鎖長が短くなるほど封入率も低くなることが明らかとなった。

薬物トランスポーターの機能解析：典型的OATP1B1 基質の取り込みに対して、B 型肝炎ウイルス外殻ペプチドが阻害活性を有していることを見出した。さらに、感染試験に利用されている細胞 (HepG2) を宿主細胞として、輸送活性の高いOATP1B1 発現細胞を作成した。同様に当該ペプチドと相互作用する NTCP に対して阻害活性を有している化合物 (pioglitazone) について、OATP1B1 との選択性を確認することが出来た。

### C-1.2. 先端的分析評価法を用いた製剤開発及び製造工程管理に関する研究

溶解型製剤の可溶/析出評価法の効率化・迅速化を目的とした動的散乱法を用いた粒度分布評価：調製物 A-3 では目視による白濁および粒度分布測定でピークが検出された。一方で、製品 A-2

では目視では澄明だが、粒度分布測定でピークが検出された。目視では検出できない薬物の配合変化による不溶性微粒子を、動的散乱法では検出できる可能性が示された。

弱塩基性化合物における食事の影響を評価可能な In vitro の溶出試験評価系の構築：胃内を模した溶出試験では、摂食時よりも絶食時の方が高い溶解量を示した。腸内を模した溶出試験では、絶食時において、溶解量が顕著に減少し、目視でも析出が認められた。従って、化合物 A が過飽和を生じた後、析出したことが明らかとなった。一方、摂食時においては、溶解度の減少に伴う溶解量の減少が見られた。絶食時及び摂食時の溶解量プロファイルの曲線下面積 (AUC) をそれぞれ求めたところ、 $AUC_{絶食時}=264 \text{ mg}\cdot\text{min}$ 、 $AUC_{摂食時}=201 \text{ mg}\cdot\text{min}$  であり、両者の比は  $AUC_{絶食時}/AUC_{摂食時}=1.3$  であった。化合物 A の in-vivo データでは、時間-血中濃度曲線の AUC 比は 1.03 (In-vivo においては食事の影響はなし) であったことから、in-vivo の AUC 比に近い結果を得ることが出来た。

塩化合物の  $C_0$  および  $pK_a$  より脱塩・フリー化の有無を予測できる脱塩判定式の作成：原薬は添加剤との配合により脱塩する化合物 A 群と、脱塩しない化合物 B 群に分類された。また、両化合物群の水中での溶解挙動を調査した結果、化合物 A 群と化合物 B 群では溶解特性が異なり、固体中での脱塩と水中での溶解特性には相関があることが明らかとなった。さらに、保存湿度に関する調査結果から、脱塩スピードは原薬や添加剤の種類によって相違する可能性が示唆された。水への溶解に関する 2 種の式を用いて、原薬の  $C_0$ 、 $pK_a$  及び対イオン種から成る脱塩判定図を考案した。これにより、製剤中における原薬の脱塩・フリー化を理論的に予測することが可能となった。

連続製造工程におけるリスクアセスメント及

びPAT ツールを用いた連続製造工程のリアルタイムモニタリング：連続造粒工程のリスクアセスメント結果から、含量均一性、溶出性及び錠剤硬度が高リスクと考えられ、予備混合粉末の含量均一性及びに造粒品の粒度分布、密度、水分が品質に大きな影響を与える可能性のある p-CMA (Potential Critical Process Parameter) と考えられた。リスクアセスメントの結果抽出された p-CMA に影響を与える可能性のある工程パラメータ (p-CPP) を抽出するために Fishbone diagram による分析を行った。本研究の対象は連続製造工程であり、予備混合粉末の混合均一性は前工程にあたることから本研究の対象外とし、造粒物の粒度分布、密度、水分に影響を与える因子を特定した。その結果、連続造粒工程において、結合液供給速度と排出口からサンプリングした湿潤体のオフラインでの水分値は良好な相関が確認された。供給機による精密な定量切出し性能と連続造粒機による高い溶液分散混合性能が示され、また得られた水分値についてもほぼ理論値に近い数値を示した。このオフラインの水分値と近赤外分析スペクトルで水分予測検量線を作成した。なお、多変量解析には 1300~1600nm の水の吸収域を用いたところ非常に高い相関を得ることができた。この予測モデルを用いて Run1 および Run2 条件における水分値を予測した。その結果、エアパージによる外乱を除くと結合剤供給速度の変化とともに予測水分が増加した。従って、近赤外による測定によって水分含量を良好に予測できているものと推定された。

連続造粒による粒子径モニタリングでは、造粒初期の供給量増加による平均粒子径の増加および供給停止時の平均粒子径の減少を捉えていた。しかし途中の水分量の増加による平均粒子径の増加は捉えていなかった。そこで得られた湿潤顆

粒を流動層にて乾燥させ、その顆粒を篩法によって粒度分布を測定した。その結果、結合剤供給速度が増加するとともに乾燥顆粒の平均粒子径は大きくなる傾向を示していた。よって、湿潤顆粒についても結合液供給速度が速いほど、平均粒子径が大きいと考えられ、結合液供給速度を増加させている途中の結果は実際に生成する造粒物変化を反映できていないと推定された。

テラヘルツ波等振動分光を用いた口腔内崩壊錠の品質特性評価：高湿度曝露におけるロラタジン OD 錠のテラヘルツ波形の変化を調べたところ、0 THz~2.5 THz の範囲で 1.01 THz ( $33.6 \text{ cm}^{-1}$ ), 1.12 THz ( $37.3 \text{ cm}^{-1}$ ), 1.44 THz ( $48.0 \text{ THz}$ ) 及び 1.91 THz ( $63.6 \text{ THz}$ ) に特徴的な吸収が観察された。また、添加剤である D-(-)-マンニトールでは、1.10 THz ( $36.6 \text{ cm}^{-1}$ ), 1.48 THz ( $49.3 \text{ cm}^{-1}$ ) 及び 2.28 THz ( $75.9 \text{ cm}^{-1}$ ) に特徴的な吸収が観察された。ゼラチンでは 1.0~1.5 THz の範囲で特徴的なブロードの吸収を示した。クエン酸無水物では 1.68 THz ( $55.9 \text{ cm}^{-1}$ ) 付近に特徴的な吸収が観察された。

各標準物質から得た特徴的なテラヘルツ吸収から、ロラタジン OD 錠の 1.12 THz 及び 1.44 THz の吸収は D-(-)-マンニトールの吸収の位置に極めて近く、D-(-)-マンニトール由来の吸収であると結論した。一方で、1.01 THz 及び 1.91 THz に観察された吸収は何れの添加物のスペクトルにおいても該当する吸収はなく、主薬成分であるロラタジン由来の吸収である可能性が高いものと推察した。

一方、高湿度 (75%RH) 曝露後に得たテラヘルツスペクトルでは、0.5 THz~2 THz の範囲で 5 か所の吸収の変化が観察された。これらの吸収のうち、新たに出現した 1.66 THz ( $53.5 \text{ cm}^{-1}$ ) 及び 1.71 THz ( $56.9 \text{ cm}^{-1}$ ) と吸湿に由来する変化かどうか確

認するため、1分及び3分間の高湿度曝露後のOD錠を測定したところ、経時的に相関がある吸収強度の変化は観察されなかった。さらに同様に高湿度環境に曝露したD-(-)-マンニトールを10w/w%含むポリエチレンディスクを測定した結果、同様に再現性のない吸収強度の変化が観察された。この2つの吸収の変化が吸湿によるものではない可能性を考慮し、バックグラウンド測定時に乾燥空気のパージを停止したところ、バックグラウンド波形上の当該周波数付近に吸収が発現したことから、パージ停止による水蒸気の光路への浸入が影響した可能性が高いものと推察した。実験室における湿度は36%RHで一定に保たれており、また装置は試料室扉と外部扉と二重に外部環境と遮断されているが、乾燥空気のパージ停止直後から雰囲気環境が光路内に流入する構造であることが考えられた。他の吸収については、現在、確認中である。

一方、雰囲気曝露におけるロラタジンOD錠のテラヘルツ波形イメージの揭示変化についても検討した。得られたイメージについて、高い透過率を示した3点を選定し、透過したシグナルの強度を経時的にプロットしたところ、2THzのテラヘルツ波の透過率が経時的に減少（吸収が増大）していることが判明した。実験室内の温湿度が28℃、36%RHで一定に保たれていること、またテラヘルツ波は雰囲気中を伝搬していることから、この現象は光路上の水蒸気の変化ではなく、吸湿により2THz付近の吸収強度が高くなっている可能性が高いものと推定された。

### C-1.3. 難水溶性薬物製剤の製剤特性の評価技術の開発

コアモルファスの形成を予測する評価手法の確立：インドメタシン、シメチジン、フェロジピン、ニフェジピン、ナプロキセン、ロラタジン、

イトラコナゾール、スクロース、D-サリシン、マルチトール、プロブコール、トレハロース、クロトリマゾール、カルベジロールをモデル化合物として、コアモルファスが形成される組み合わせを調査した。その結果、幅広い薬物の組み合わせでモル比1:1のコアモルファスが形成されることが明らかとなった。

非晶質の安定性を予測する評価手法の確立：インドメタシン及びフェロジピンの系をモデルとして、構成モル比を1:5、1:3、1:1、3:1及び5:1に変化させたco-amorphousを、シリカゲルの存在下、40℃で保存し、その粉末X線回折パターンを測定の結果、それぞれ、保存開始5日後、6日後、10日後、11日後及び7日後に薬物結晶に由来する回折ピークが認められ、構成モル比により安定性が変化することが明らかとなった。同様の条件で保管したインドメタシン及びフェロジピン単体の非晶質は、それぞれ2日後及び1日後に結晶化が確認されているため、いずれのモル比のコアモルファスにおいても、薬物単体の非晶質と比較して、物理的安定性が改善されることが確認された。

非晶質の吸湿性評価：コアモルファスの利点の1つとして、適切な薬物の組み合わせを選択することにより、吸湿性を抑えることが可能であり、固体分散体において問題となる、吸湿による $T_g$ 低下を起こしにくいことが期待されている。しかしながら、コアモルファスの吸湿性に関する具体的な評価は未だ行われておらず、効果的な薬物の組み合わせや、固体分散体と比較してどの程度吸湿性を抑えられるのかは、明らかとなっていない。そこで、各種薬物の非晶質体及びこれらを組み合わせで調製したコアモルファスにつき、25℃60%RHの条件下で3時間保存した際の水分含量を測定することにより、吸湿性を評価した。その結

果、薬物単独の非晶質の吸湿性は、薬物の種類によって大きく異なり、溶解性の高い薬物ほど、高い吸湿性を示すことが明らかとなった。コアモルファスの吸湿性も、薬物の組み合わせにより大きく異なり、薬物単独の非晶質状態での吸湿性が低い薬物同士の組み合わせのコアモルファスにおいて、吸湿性が低いことが明らかとなった。

ニフェジピンとニコチン酸アミドのコアモルファスの保存安定性と分子運動性の関連：ニフェジピンとニコチン酸アミドのモル比が 3:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:9 の混合物を熔融急冷して得られた試料は、いずれのモル比においても 1 つの  $T_g$  が観察され、コアモルファスが形成されていることが示された。コアモルファスを 20°C/分の速度で昇温すると、モル比 1:9, 1:3, 3:1 のコアモルファスはガラス転移によるベースラインの断絶と結晶化あるいは結晶転移による発熱ピークが観測された。これに対しモル比 1:1 と 1:2 のコアモルファスにおいては、DSC 測定中の結晶化が見られず、物理的な安定性は両薬物の混合比によって異なることが示された。モル比 1:1 のコアモルファスを保存し、結晶化させた試料の粉末 X 線回折 (PXRD) パターンは  $2\theta = 7.3, 9.0, 10.5-10.7, 12.2, 16.7, 24.0$  に特徴的なピークが見られた。これらのピークはニフェジピンあるいはニコチン酸アミドの PXRD パターンには見られず、結晶化の過程においてニフェジピンとニコチン酸アミドのコクリスタルが形成されていると考えられる。ニフェジピンとニコチン酸アミドのモル比 3:1 のコアモルファスを保存して結晶化させた試料はニフェジピンの安定形結晶に由来するピークとコクリスタルのピークが足し合わされたような形状が見られた。ニコチン酸アミドと相互作用したニフェジピンはコクリスタルを形成し、相互作用できない過剰のニフェジピンが単独で結晶化し

たものと考えられる。

ニフェジピンとニコチン酸アミドのモル比 3:1, 1:2, 1:3, 1:9 のコアモルファスを 40°C 保存すると非晶質ニフェジピンより速やかに結晶化した。ニフェジピンとニコチン酸アミドのモル比 1:1 のコアモルファスは非晶質ニフェジピンより  $T_g$  が約 25°C 低いにもかかわらず、40°C における結晶化速度は非晶質 NFD とほぼ同等であった。また、25°C 保存においては、非晶質ニフェジピンよりも結晶化速度が有意に低下していた。

DSC 測定と PXRD パターンの解析より、ニコチン酸アミドとのコアモルファス化により、非晶質ニフェジピンの物理的な保存安定性が向上していることが判明し、コアモルファスの結晶化速度には、非晶質マトリクスの分子運動性が大きく影響していることが分かった。

また、結晶加速度と分子運動性の関連を検討するため、非晶質ニフェジピンについては分子運動性の指標としてエンタルピー緩和時間を測定した。一方、エンタルピー緩和時間は  $T_g$  以上の温度では実験的に測定できないため、 $T_g$  が 25°C より低いモル比 1:1 のコアモルファスの分子運動性はフラジリティパラメータ等の値から Vogel-Tammann-Fulcher (VTF) 式および Adam-Gibbs-Vogel (AGV) 式を用いて緩和時間を算出した。15°C におけるモル比 1:1 のコアモルファスの緩和時間は非晶質ニフェジピンの緩和時間の 5 倍の値であり、非晶質ニフェジピンに比べ分子運動性が低いことが示された。しかし、コアモルファスの緩和時間は  $T_g$  (約 18°C) 以上の温度において急激に減少し、40°C においては非晶質ニフェジピンの緩和時間の約 1/50 の値が算出された。モル比 1:1 のコアモルファスが、25°C では非晶質ニフェジピンよりも優れた安定性を示したにも関わらず、40°C では結晶化速度が非晶質ニフェジ

ピンとほぼ同等安定性を示したのは、この分子運動性の大幅な増大(緩和時間の減少)が原因と考えられた。

共非晶質医薬品の構造安定性に及ぼす物理化学的因子に関する研究: モデル薬物として8種の非ステロイド性抗炎症薬 (Naproxen (NAP), Indoprofen (IPF), Felbinac (FEL), Loxoprofen (LOX), Aceclofenac (ACE), Indomethacin (IMC), Ketorprofen (KET), Flufenamic acid (FFA)) を用い、コアモルファス形成に寄与する物理化学的要因に関して研究を行った。まず、モデル薬物の結晶化傾向について評価した。DSCの熔融-冷却-再熔融過程において熔融後、冷却中に結晶化した薬物を class I, 再熔融中に結晶化した薬物を class II と定義した。また、DSCの測定中に結晶化しない高い非晶質安定性を示す薬物を class III とした。本研究に用いた薬物の中では NAP, IPF, FEL が class I 化合物であった。次に、これらの薬物に対し、他の薬物を 1:1 モル比で配合し、DSC 測定を行った。IPF, FEL では著しい安定性の改善は見られなかったが、NAP においては LOX, ACE, IMC と組み合わせることで安定な非晶質形態である class III へ変化することが示された。また、NAP と KET あるいは FFA との組み合わせでは class II へ変化した。これら NAP と他の薬物の配合により class II もしくは III へと転移したものをコアモルファスと定義し、コアモルファス化への物理化学的パラメーターの寄与を PLS-DA で評価した。入力変数として薬物の結晶化傾向ならびに各物理化学的パラメーターを、応答変数として NAP と他の薬物を組み合わせた時の結晶化 class を用いた。スコアプロットは、NAP と配合して class III となる薬物は比較的左側に、一方 NAP の結晶化を抑制しなかった薬物 (class I から変化しない) は右側にプロットされた。

コアモルファス製剤の保存安定性と製剤の熱力学的パラメーターの研究: イトラコナゾール (ITZ) 原薬, 各有機酸 CCF (フマル酸 (FA), コハク酸 (SA), 酒石酸 (TA)) とともにテトラヒドロフラン (THF) に良好な溶解度を示したため, ITZ/CCF = (2:1), ITZ 15 mg/mL 相当で THF に溶解し, EtOH で等倍に希釈して孔径 5.5  $\mu\text{m}$  のノズルより噴霧したところ, 噴霧乾燥品の粉末 X 線パターンは全体として非晶質を示すハローパターンとなったが,  $2\theta = 15\text{-}20^\circ$  付近にやや結晶由来のピークが残存していた。噴霧条件の最適化として, 粘性を上げ, また, 噴霧量を減少させるため, THF に溶解後の希釈を 3 倍量とし, 孔径 4.0  $\mu\text{m}$  のノズルで噴霧したところ, 15-20  $^\circ 2\theta$  のピークが消失したほぼ非晶質の粉末 X 線パターンを持つ噴霧乾燥品を得た。市販製剤の製造に用いられる技術であるスプレードライヤーでの調製が可能となったことで, コアモルファスのスケールアップ, 商用製造の可能性が示された。

各噴霧乾燥品の固体  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルにおいて, ITZ 分子由来のピークは, ほぼ ITZ 単体非晶質のものと一致し, ITZ 分子シグナルからは相互作用は確認されなかった。一方, 噴霧乾燥品の CCF のピークは CCF 単体のピークと異なり, コクリスタルと同様の位置へとシフトしており, 噴霧乾燥品中の ITZ と CCF 分子はコクリスタルと同様の相互作用をし, コアモルファスを形成していると考えられた。しかし, 粉碎により調製した FA および TA とのコアモルファスについては, CCF 由来のピークが二種類観測され, 相互作用の様式, 強度に違いがある可能性が示された。

噴霧乾燥品の安定性は, 粉碎品と同様の傾向を示し, FA とのコアモルファスは物理的及び化学的に安定であり, SA とのコアモルファスはコクリスタルに結晶化するが, 化学的に安定であった。TA

とのコアモルファスは ITZ 単体に結晶化し、化学的には不安定であった。噴霧乾燥により粉碎品と同様の安定性の傾向を示すコアモルファスが調製されていることが確認された。

非晶質製剤の安定性評価技術の開発：スルファメタジン (SMT) は単独で粉碎を行っても結晶性の低下はわずかであった。SMT に不純物としてスルファジアジン (SDA), スルファメラジン (SMR), スルファモノメトキシシン (SMM), スルファジメトキシシン (SDM) を加えると、粉碎による結晶性低下傾向が大きくなった。不純物混入量を 1~5% で変化させて粉碎したときの 5 時間後の見かけの結晶化度は SDA, SMR 添加系においては 2% 以下では結晶性低下傾向は小さく、3% 以上で大きく結晶性が低下した。一方、SMM, SDM 添加系においては 1% 添加でも粉碎による結晶性の低下が認められた。

また、SMT 及び SMT に不純物を 5% 混入させた場合でも熔融急冷により非晶質を形成することを確認した。40°C/75%RH に 1 日保存すると、不純物の有無に関わらず全ての試料で結晶化するが、40°C/乾燥下では、SMT 単独では結晶化を示す回折ピークの存在が確認されるが、不純物を 5% 混入した系はいずれも非晶質を維持していた。

難溶性薬物の過飽和溶解と安定化メカニズムの解明：難水溶性薬物のモデルとしてフェニトイン (DPH) とグリベンクラミド (GBM) を選び、Eudragit® S100 (S100) との固体分散体を噴霧乾燥法によって調製した (薬物含量 5-75%) とし、調製した固体分散体の PXRD パターンは、ハローパターンとなり、非晶質であることが示された。

回転円盤法により得られた各 SPD からの薬物及び S100 の溶出プロファイルは原点を通る直線を示した。この回帰直線を最小二乗法により求め、(2) 式に基づいてそれぞれの溶出速度  $A$

[mg/min/cm<sup>2</sup>] を算出した。

$$A = (k \cdot V) / (S \cdot x) \quad (2)$$

$k$  は回帰直線の傾き、 $V$  はそれぞれ試験液の容積 (500 mL)、 $S$  はディスクの表面積 (1.33 cm<sup>2</sup>)、 $x$  は試料全体に対する各成分の含量 (5-95 %w/w) を表す。いずれの DPH 含量の DPH/S100 SPD においても DPH 及び S100 の溶出プロファイルは良好な直線性 ( $R^2 \geq 0.97$ ) を示した。

ついで、溶出試験中の錠剤について PXRD 測定を行ったところ、DPH 含量 10% の DPH/S100 SPD の場合、試験開始 60 分後においても PXRD パターンはハローパターンを示し、DPH の非晶質状態の維持が認められた。一方、DPH 含量 50% の DPH/S100 SPD では、試験開始 60 分後に DPH 結晶由来の回折ピークが認められ、一部の非晶質 DPH が結晶化したことが明らかとなった。このことから、薬物含量が高い DPH/S100 SPD で DPH の溶出速度が S100 の溶出速度よりも有意に低い値を示したのは、DPH/S100 SPD 中の DPH が溶出試験中に結晶化したためと考えられた。それに対し、GBM/S100 SPD の場合は薬物含量によらず試験開始 60 分後においても GBM 結晶由来のピークは認められなかった。固体分散体中の GBM の非晶質状態が維持され、固体分散体から薬物及びポリマーが同時に拡散層を通過してバルクへ放出されると推察された。

DPH/S100 固体分散体中の薬物の分子状態を <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR 測定により評価した。DPH/S100 SPD では DPH の C<sub>(8)</sub> に由来するピークの化学シフトは薬物含量の減少に伴い変化し、DPH 含量 10% の DPH/S100 SPD (140.5 ppm) と比較して DPH 含量 50% の DPH/S100 SPD (139.8 ppm) では高磁場側へ 0.7 ppm 変化した。

#### C-1. 4. 体内環境を反映した製剤機能の評価法と製剤技術に関する研究

フロースルー法を用いたサリチル酸錠の溶出

性検討では、参考文献に類似した結果が得られ、その標準偏差や相対標準偏差から、値の併行精度や再現性はパドル法と同程度と考えられた。3機関の溶出プロファイルにおいても日間差は小さく、バラツキの程度も研究機関1と同様であった。なお試験の平均溶出率は、研究機関2の240分時点において他機関に比べ約10%程度高い結果となった。試験機関1で行ったルフィナミド錠の評価では、USPの規格（5時間で60%以上、12時間で80%以上）に適合し、試験ごとのバラツキや日間差はサリチル酸錠と同様に小さい傾向が見られた。3機関の溶出プロファイル評価においても全ての製剤が規格に適合し、明確な機関差（装置間差）は認められなかった。

Pluronic F127 溶液（分子量 約 12,600, 15 mL）を入れた透析カートリッジを、カルバマゼピン（2 mg/mL）を含む試験液中で6時間まで攪拌保持することにより、カルバマゼピン濃度の低下による外液の吸光度（254 nm）低下が観察され、カートリッジ内への移行が確認された。一方で同試験中でのPluronicの漏出は認められなかった。

吸入剤の流量を変えて測定したFPD, MMADおよびGSDのうち、FPDは吸入流量に依存して増大し、一方、MMADは小さくなる傾向が認められた。またGSDについては、NGIにおいて約1.8-1.9と、吸入流量に依存せずほぼ一定の値を示すことが明らかとなった。FPDについてNGIをACIと比較したとき、30 L/min および 60 L/min では装置間差が認められなかったのに対し、90 L/min ではACIで低くなる傾向が認められた。同様にMMADについても、90 L/min で試験した場合において、NGIとACIの差が大きくなる結果となった。GSDは、28.3 L/min および 60 L/min においてはACIが低く、90 L/min ではACIが高くなることが明らかとなった。

微小構造と機能特性の検討を目的として作成したリポソームのサイズは、PGA 4 mg/mL 溶液を用いたものを除きいずれも約100nmとなり、 $\zeta$ -電位はいずれも中性から負電荷を示した。またPGAの平均分子量および濃度を変えた条件でいずれも95%以上の高い薬物封入率を得ることができた。すなわち、本検討で用いたPGA分子量と濃度範囲では高率でドキシソルビシンを封入できることが明らかとなった。

透析法を用いたリポソームからの薬物放出性評価では、PGAを含まない0.65 M TEA 溶液で調製したリポソームが48時間で22%と最も高い放出率を示した。平均分子量9,800または20,500のPGAの4 mg/mL 溶液を用いて作成したリポソームでは放出が抑制され、内水相での高いドキシソルビシン封入安定性が示された。一方で低濃度または低分子量PGAを用いたリポソームではPGA不含のリポソームと同様の放出率を示した。これらの結果から高濃度および高分子量のPGAにより、リポソームからの薬物放出を抑制できることが明らかとなった。LLC細胞に対するドキシソルビシンの細胞増殖阻害作用を評価したところ、高濃度および高分子量のPGAを用いたリポソームでは、ドキシソルビシンの作用が減弱した。

リポ化製剤からトコフェロール酢酸エステル（LogP:10.5）以外の薬物は、混和直後（0分）で約40%と速やかな薬物放出を示した。アムホテリシンB（LogP:0.8）は50%~70%の範囲で経時的に薬物放出率が増加する挙動が認められたが、シクロスポリンA（LogP:1.8）、タクロリムス（LogP:4.1）では経時的な薬物放出率増加は認められなかった。血漿の混合比を変えた測定において、トコフェロール酢酸エステル以外の薬物は、製剤に対する血漿の割合が増加すると共に混和直後の放出率も増加した。以上の結果から、モデル薬物の放

出挙動は可溶化している薬物の性質 (LogP) に依存していることが示唆された。また、薬物放出の大部分は、血漿との混和直後に起きることが明らかとなった。

リポ化製剤と血漿の混合比により、薬物放出率が変化することから、脂肪粒子と血漿間で薬物の化学平衡が起きることが示唆された。血漿との混合比に依存した薬物放出率の増加を示すシクロスポリン A とタクロリムスは、生体内において大量の血漿による希釈を受け、即座に全ての薬物を放出すると考えられた。

### C-1.5. iPS 細胞等由来樹状細胞を用いたエンドトキシン等発熱性物質検出法の開発研究

iPS 細胞等由来樹状細胞を用いたエンドトキシン等発熱性物質検出法の開発：得られた樹状細胞について、FACS 法による細胞表面表現型を解析した結果、CD14<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CD83<sup>+</sup> HLA-ABC<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> CD40<sup>+</sup> IL-12<sup>+</sup>の成熟樹状細胞の特徴を示した。

ヒト iPS 細胞由来樹状細胞の解析とエンドトキシン測定法への適用に関する研究：LPS に対する反応性を検討したところ、新鮮血由来の単球は低濃度の LPS に反応して LPS の濃度依存的に TNF- $\alpha$  及び IL-6 を放出した。一方、凍結ヒト単球及びヒト末梢血由来樹状細胞は、新鮮血由来の単球に比べて、TNF- $\alpha$  及び IL-6 のいずれも著しく低い反応性であった。ヒト末梢血由来樹状細胞では、低レベルではあるが TNF- $\alpha$  の恒常的な放出が認められた。LPS に対する反応性の高い新鮮末梢血単球由来のマクロファージを用いて血清の影響を検討した結果、ウシ胎児血清の存在下で強い TNF- $\alpha$  の放出が認められ、血清成分が反応を増強している可能性が示された。

リムルス試験による樹状細胞等を用いたエンドトキシン測定法の検証に関する研究：凍結ヒ

ト単球を用い単球活性化試験を行ったところ、エンドトキシン標準品では 0.25-2 EU/mL の範囲で IL-1 $\beta$  の産生が確認された。一方、*E. coli* 由来 LPS では 1-2 EU/mL の範囲で IL-1 $\beta$  の産生が確認されたが、その反応性はエンドトキシン標準品に比較して低かった。エンドトキシン標準品又は *E. coli* 由来 LPS でヒト末梢血由来樹状細胞を刺激したが、IL-1 $\beta$  の産生は確認できなかった。今回用いた樹状細胞は CD14 陰性の成熟樹状細胞であったことから、可溶型 CD14 の供給を目的として市販のヒト血清存在下でエンドトキシン標準品及び *E. coli* 由来 LPS で刺激したが、IL-1 $\beta$  産生は認められなかった。

オゾン過酸化水素混合ガスを用いたエンドトキシン等発熱物質不活化法の開発：塗布量 10 ng の EI に単独暴露 (30 $^{\circ}$  C, 4 時間) の不活化率は、オゾンガス 800 ppm では 38.08%, 過酸化水素ガス単独 800 ppm では 83.06%だった。混合ガス暴露 (オゾン 800 ppm : 過酸化水素 800 ppm) の不活化率は 99.41%で、暴露時間を 8 時間に延長しても効果は変わらなかった。同一の混合ガス濃度 (オゾン 800 ppm : 過酸化水素 800 ppm, 4 時間) で温度条件を上昇させると、50 $^{\circ}$  C で 99.9%の不活化率を得た。

## C-2 先端的バイオ医薬品の品質・安全性確保のための評価法の開発 (II グループ)

### C-2.1. バイオ医薬品の糖鎖試験法に関する研究

#### C-2.1.1.0-結合型糖鎖試験法の標準化

これまでに、単糖分析、中性オリゴ糖及び酸性オリゴ糖分析の標準的な試験法について検討を行い、平成26年3月に日本薬局方糖鎖試験法案の提案を行った。しかしながら、0-結合型糖鎖修飾の解析に関しては、遊離に適した酵素がなく、アルカリ $\beta$ 脱離に基づく遊離法が用いられるが、そ

の遊離効率はアミノ酸配列及び糖鎖構造により影響を受けること、遊離糖鎖が還元末端から順次分解（ピーリング反応）すること、シアル酸の脱離などの人為的な変化が生じる恐れがあるなどの課題があり、糖鎖標準的な試験方法が明確でない。そこで、O-結合型糖鎖分析及び糖ペプチド分析に関して、試験法設定において留意すべき事項を明らかにし、分析法の標準化を行うことを目的にした検討を行った。

#### (1) 非還元的アルカリ $\beta$ -脱離

アバタセプトおよびウシフェツインよりカルバミン酸アンモニウムを用いた非還元的アルカリ $\beta$ -脱離にてO-結合型糖鎖を遊離させ、2-AB誘導体化及びHILIC/FL分析を行った。ピーリング反応による副生成物は検出されたが、非常に低く抑えられていた。

#### (2) 還元的アルカリ $\beta$ -脱離

遊離した糖鎖をMALDI-TOF MSを用いて測定したとき、組成が $\text{NeuAc}_0\text{-}_2\text{Hex}_1\text{HexNAc}_1$ に相当するアルジトール型のO-結合型糖鎖の $\text{Na}^+$ 付加分子が、 $m/z$  408.26, 699.38及び990.44に観測された。遊離反応時の温度及び時間によるアルジトール型シアロO-結合型糖鎖のシグナル強度の変化を図2に示す。80°Cで1時間程度の反応あるいは40°Cから60°Cで4時間程度の反応が適していると考えられた。

#### (3) PMP誘導体化

アルカリ  $\beta$ -脱離と同時にPMP誘導体化を行い、MALDI-TOF MSで測定したところ、2分子のPMP（その内1分子からは $\text{CH}_2$ が脱離）が結合した中性およびシアロO-結合型糖鎖が $\text{Na}^+$ 付加分子として $m/z$  736.49, 1027.27及び1318.18に検出された。また、ピーリング反応による副生成物と思われる $\text{Na}^+$ 付加分子( $m/z$  824.32)も検出された。

### C-2.1.2. 凝集体評価法の開発と標準化

注射剤に含まれる分子サイズ10  $\mu\text{m}$ 以上の凝集体は、日局<6.07>不溶性微粒子試験に測定され、数十nm以下の凝集体は、通例、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により評価されるが、こ

の間の粒子径の凝集体の評価方法は明確になっていない。また、SECにおいて、凝集体がカラム担体に吸着して溶出されない、あるいは、回収率が低下する、分析中に凝集体が解離する恐れがある、などの課題がある。その他、タンパク質医薬品の<6.07>不溶性微粒子試験の適用について、低容量化が求められている。そこで、凝集体の特性毎に適した評価手法の開発と標準化、及び不溶性微粒子試験の低容量化のための検討を行った。

#### C-2.1.2.1. 凝集体評価法の分析能の比較

##### (1) 光遮蔽 (LO)

光遮蔽法では、測定結果は粒子径と計数値として得られる。そこで標準粒子を真球として、粒子径とポリスチレンの密度から、粒子数の推定値 (個/mL) を求め、測定値と比較した。なお、2  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ の粒子は、10  $\mu\text{g/mL}$ においてそれぞれ約 $2.3 \times 10^6$ ,  $1.5 \times 10^5$ ,  $1.8 \times 10^4$ 個/mLの粒子濃度となる。

10  $\mu\text{m}$ の粒子では、いずれの機関も0.25  $\mu\text{g/mL}$ ~5  $\mu\text{g/mL}$ までの間で、推定の粒子数と測定値との差は20%以内であった。低濃度での誤差の原因は、標準粒子の量が少なくなることから (0.1  $\mu\text{g/mL}$ 時の推定値は約175個/mL)、バックグラウンドで混入した粒子の影響が無視できなくなった結果と考えられる。5~10  $\mu\text{g/mL}$ では、頭打ちの傾向が認められた。0.1~5  $\mu\text{g/mL}$ の回帰直線の決定係数は、いずれの機関も0.997以上であった。

5  $\mu\text{m}$ の粒子では、一機関を除き0.1  $\mu\text{g/mL}$ ~1.0  $\mu\text{g/mL}$ までの間で、推定の粒子数と測定値との差は20%以内であり、この濃度での回帰直線の決定係数は、0.998以上であった。1.0  $\mu\text{g/mL}$  (約14000個/mL) 以上の濃度で頭打ちの傾向が認められた。

2  $\mu\text{m}$ の粒子では粒子数が多すぎることから (0.5  $\mu\text{g/mL}$ で110,000個/mL) 正しく計測できなかった。適切な粒子数範囲で再検討する必要がある。

なお、粒子径分布は、低濃度では一定であったが、粒子濃度 (個/mL) が装置の測定可能な上限に近づくと分布に異常が認められた。

## (2) フローイメージング (FI)

10  $\mu\text{m}$ の粒子では、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 以上で一部のデータを除き推定の粒子数と測定値との差は20%以内であった。0.01~10  $\mu\text{g/mL}$ の回帰直線の決定係数は、いずれの機関も0.996以上であった。

5  $\mu\text{m}$ の粒子では、一機関を除き0.1  $\mu\text{g/mL}$ ~10.0  $\mu\text{g/mL}$ までの間で、推定の粒子数と測定値との差は20%以内であった。この濃度での回帰直線の決定係数は、全ての機関で0.996以上であった。

2  $\mu\text{m}$ の粒子では、10.0  $\mu\text{g/mL}$ で機器の計測数の上限に達してしまうことがあった。2機関で、0.5  $\mu\text{g/mL}$ ~10.0  $\mu\text{g/mL}$ までの間で、推定の粒子数と測定値との差は20%以内であった。1機関で0.5  $\mu\text{g/mL}$ で著しく低い測定値になった点を除くと、測定した範囲での回帰直線の決定係数は、全ての機関で0.995以上であった。

1機関では全体的に測定値が大きく出る傾向があった。この原因として、FIでは標準粒子以外のバックグラウンドで1~2  $\mu\text{m}$ の微粒子が観測されていたが、この機関において特に多く観測されたことが原因かもしれない。

なお粒子径分布は、濃度によらず一定であった。

## (3) レーザー回折 (LD)

レーザー回折は、約100nm~数mmの幅広い粒子に対して粒子径とその分布を与える装置であるが、通常、定量的な装置ではない。今回タンパク質凝集体評価を目的として開発された定量可能なレーザー回折装置を使用した。

10  $\mu\text{m}$ 及び5  $\mu\text{m}$ の粒子では、10  $\mu\text{g/mL}$ では試料濃度が薄すぎて計測に不適であった。2  $\mu\text{m}$ の粒子では、全体的に測定濃度がやや小さな値となる傾向があったが、5  $\mu\text{g/mL}$ ~100  $\mu\text{g/mL}$ で、推定値の80~90%の計測値が得られ、この範囲での回帰直線の決定係数は、全ての機関で0.992以上であった。1  $\mu\text{m}$ のシリカ粒子では、5  $\mu\text{g/mL}$ ~50  $\mu\text{g/mL}$ で、推定値と測定値との差は20%以内であり、この濃度での回帰直線の決定係数は、全ての機関で0.997以上であった。500及び900 nmの粒子では、1~25  $\mu\text{g/mL}$ で推定値と測定値との差は20%以内

であり、この濃度での回帰直線の決定係数は、全ての機関で0.997以上であった。220 nmの粒子では、2.5~50  $\mu\text{g/mL}$ で測定が可能であったが、1機関では推定値と測定値との差は20%を超えることがあった、この濃度での回帰直線の決定係数は、全ての機関で0.995以上であった。

## (4) 動的光散乱 (DLS)

動的光散乱は、粒子径及び粒子径分布を得る方法であり、定量的な方法ではない。凝集体評価法としては、タンパク質単量体のシグナルと、凝集体の粒子径及びシグナルを比較することが考えられる。そこで、標準粒子を用いて、粒子を検出可能な濃度及び得られる粒子径の精度について検討した。なお、DLSでは流体力学径が得られるので、標準粒子の粒子径とは異なった値となる。

2  $\mu\text{m}$ の粒子では、今回検討した濃度(最大10  $\mu\text{g/mL}$ )では、粒子径のばらつきや誤差が大きかった。散乱光の変動から得られた自己相関関数の質が低く、正しく分布解析できなかつたと考えられる。分析時間を延長するなどの方法が考えられるが、大幅な延長は現実的ではないと思われる。900 nmのポリスチレン粒子及び1  $\mu\text{m}$ のシリカ粒子でも、2  $\mu\text{m}$ の粒子と同様な傾向が見られた。機関間、装置間、分析条件間での違いが大きく、分析条件の最適化とともに、凝集体評価法として、この粒子径において利用可能か議論が必要である。500 nmの粒子では、0.5または1.0  $\mu\text{g/mL}$ 以上で、標準粒子の認証値の20%以内で粒子径が測定された。この時の多分散性指数(PdI)は0.4以内であった。220 nmの粒子では、0.25または0.05  $\mu\text{g/mL}$ 以上で、標準粒子の認証値の20%以内で粒子径が測定された。この時、ほとんどの場合、PdIは0.1以内であった。60 nmの粒子では、一機関を除き、0.25、0.5または10  $\mu\text{g/mL}$ 以上で、標準粒子の認証値の20%以内で粒子径が測定された。この時、ほとんどの場合、多分散性指数(PdI)は0.1以内であった。

## (5) ナノトラッキング解析 (NTA)

3回の測定結果の%RSDが10%以下、計算値と測

定値の差が20%以内、決定係数が0.99以上、の全てを満たす結果は得られなかった。

#### (6) 共振型質量測定装置 (RMM)

2  $\mu\text{m}$ の粒子では、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個/mL (約0.044 ~ 4.4  $\mu\text{g/mL}$ ) で、900 nmの粒子では、 $1 \times 10^7$ 個/mL (約0.4  $\mu\text{g/mL}$ ) で、推定値と測定値の差が20%以内であった。

#### C-2.1.2.2. 注射剤の不溶性微粒子試験法の低容量化

各種濃度の10  $\mu\text{m}$ の標準粒子を低容量化して分析した時のばらつきの変化 ( $n = 3$ ) を調べた。その結果、通常容量 (5 mL) と比べて、1 mLまたは0.2 mLで測定した場合には、相対標準偏差は約2~3倍に増加した。希釈系列を分析した時の回帰直線の決定係数は0.995以上と直線性については同等な結果が得られた。

#### C-2.1.2.3. 苛酷試験試料における不溶性微粒子数

抗体溶液製剤を40°C保管したとき、25  $\mu\text{m}$ 以上の微粒子数は10個/容器以内、10  $\mu\text{m}$ 以上の微粒子数は250個/容器以内、5  $\mu\text{m}$ 以上の微粒子数は700個/容器以内、2  $\mu\text{m}$ 以上の微粒子数は4000個/容器以内で、経時的な変動は認められなかった。別途、SECにて可溶性の会合体含量 (%) を測定したところ経時的な増加が認められ、4週間後では3倍の会合体含量となった。

#### C-2.1.3. バイオ医薬品品質試験のシステム適合性

バイオ医薬品の品質試験におけるシステム適合性設定の課題を明らかにし、バイオ医薬品の品質試験に適したシステム適合性設定の考え方を明らかにすることを目的に、HPLC (ペプチドマップピング、糖鎖プロファイル、SEC、RP)、CE (等電点、SDS)、SDS-PAGE、ELISAに関して、システム適合性試験の設定事例に関するアンケート調査を実施した。現在、意見を集約中である。今後、参加企業との議論を経て、システム適合性の要件を明らかにする。

#### C-2.2. 新たな生産基材により生産されるバ

#### イオ医薬品の品質安全性評価に関する研究

わが国で開発された新たな生産用基材であるTgカイコを用いて製造されるバイオ医薬品の品質安全性評価・管理手法の確立のため、HCP (宿主細胞由来タンパク質=カイコ繭由来タンパク質) 評価系の構築、及び、Tgバンク作製技術の開発を行った。

#### C-2.2.1. 抗カイコ繭由来タンパク質測定法の構築

カイコ繭タンパク質に対する抗体を作製し、特異性の評価を行ったところ、抗血清は、BSAにはほとんど反応しなかったが、繭タンパク質には強く反応し、特異抗体が産生されていることが確認された。抗繭由来タンパク質IgGを用いて、繭由来タンパク質のウエスタンブロットを行った。200kDa前後に検出される最もメジャーな繭タンパク質であるセリシンに加え、広い分子量範囲でマイナーな繭タンパク質が検出された。

カイコ繭由来タンパク質を検出するサンドイッチELISAを構築し、感度および直線性ともに良好な結果が得られることを確認した。同時再現性試験および測定間再現性試験を行ったところ、C.V. 値は、いずれも10%程度以内であった。また、検出限界は0.16ng/mLと算出された。

Tgカイコ繭から組換えタンパク質を抽出する工程で得られた溶液 (抽出液、工程1、工程2) をサンプルとして用いて、残留HCP濃度を測定した。結果は、それぞれのサンプルをSDS-PAGEにより推定した場合の残存HCP量と良く一致しており、作製したELISAが残存HCPを定量するために有用であると考えられた。

#### C-2.2.2. Tgカイコを用いるバイオ医薬品製造の工程管理手法の開発

Tgバンクの作製・管理手法の開発のため、ニュートラルレッドを含む人工飼料の利用により卵巣を染色し、組織の識別を簡易化する方法による卵巣採取の効率化を図った。また、卵巣に隣接する組織である紐体と共に卵巣を採取し、再移植の際にレシピエントの紐体と絡めることで、移植後

の産卵効率の向上を図った。これらの改良の結果、Tgカイコの凍結・融解卵巣をレシピエントの輸卵管に絡ませた移植、及び、凍結・融解精液の人工受精との組合せでは、受精卵産卵率が30%を超えるレベルに達した。組織採取・凍結・再移植の手法について、さらに改良を行うと共に、今年度からは大型液体窒素タンクを用いたTgバンクの本格的な運用試験を開始した。

個体選別法としては、卵や幼虫の全身で恒常的に強く発現するプロモーターと蛍光タンパク質を組み合わせた新たな組換えマーカーが本年度に開発され (Tsubota et al., G3, 4:1347-1357, 2014), 卵でも早期選抜可能な、有用な組換えマーカーであることが示された。

### C-2.3. LC/MSによるバイオ医薬品の血中濃度測定技術の開発

高分子薬物の血中濃度測定において、LC/MSを用いた選択反応モニタリング (SRM) 測定法は、リガンド結合法による測定を補完する手法として注目されている。一方、LC/MSによる分析は、マトリックス等の影響により分析が困難なことがあり、測定方法の最適化が課題となっている。また、既存分析法バリデーションのガイドライン\*を適用することが難しい場合があることも指摘されている。そこで本年度は、抗体医薬品を添加したマウス血清を試料として、多機関共同研究により、測定方法の最適化を検討するとともに、既存ガイドライン\*に従いバリデーションを行い、同ガイドライン\*\*の基準の適用の可否を検討した。また、内標準物質として、安定同位体標識Fabの作製を開始した。

\*「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」薬食審査発0711第1号 H25年7月11日 (LCガイドライン)

\*\*「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法 (リガンド結合法) のバリデーションに関するガイドライン」薬食審査発0401第1号 H26年4月1日 (LBAガイドライン)

### C-2.3.1. 各機関により採用された前処理条件概要

①タンパク質精製：7機関中6機関で、有機溶媒を用いた沈殿法が採用された。6機関中5機関がメタノール沈殿を、1機関がアセトン沈殿法を採用した。

②還元/アルキル化操作：酵素消化前に、2機関が還元アルキル化を行った。また、1機関はDTTによる還元操作のみ行った。

③トリプシン消化条件：トリプシン溶液の濃度は1~20 mg/mL, 消化温度は37°Cまたは60°C, 消化時間は1~20時間であった。

④ペプチド精製方法：酵素消化後に、固相抽出によるペプチド精製を行った機関は4機関であった。2機関は固相抽出のみ、1機関はフィルター処理のみ、残りの1機関については固相抽出及びフィルター処理を併用した。

各機関により検討された測定方法の概要を表9にまとめた。

### C-2.3.2. 分析法バリデーション

5機関でバリデーションを実施した。結果の概要は、以下のとおりであった。

①選択性：機関Bにおいて、一個体でSIL-ISの妨害ピークが確認されたことを除き、analyte及びSIL-ISの妨害ピークは検出されなかった。

②検量線、及び定量限界 (LLOQ)：いずれの機関も相関係数は0.9946~0.9987の範囲であり、直線性は良好であった。検量線用標準試料の各濃度の真度は、3機関では±15%以内であったが、2機関で±15%を超える濃度点がみられ、そのうち1機関は、20%以上となる濃度点が確認された。選択性、真度及び精度等に基づいて定められたLLOQは、0.5~3.9 µg/mLの範囲であった。

③真度及び精度：QC試料の分析により評価した。各濃度における平均真度は、2機関で±15%以内と良好であったが、3機関で±15%以上となる濃度点が確認され、そのうち2機関では±20%以上となる濃度点がみられた。一方、平均精度は、全ての機関が15%以下 (LLOQ, 20以下) であり良好であっ

た。

④マトリックス効果：個体間の精度は、3機関で15%以下であったが、2機関については15%以上となる濃度点がみられた(1機関は20%以上)。⑤キャリアオーバー、希釈の妥当性、及び安定性：キャリアオーバーは、5機関中4機関は良好であった。また、希釈妥当性及び安定性については、試験を実施した全ての機関で、良好な結果が得られた。

### C-2.3.3. SIL-Fab 発現系の作製

作製したFab発現株を<sup>15</sup>N標識硫酸アンモニウム、及びL-メチオニンを含有した培地を用いて培養した後、培養上清のSDS-PAGEを行った結果、H鎖及びL鎖より構成されたヘテロダイマーのFabを確認することができた。

### C-2.4. リガンド結合法によるバイオ医薬品の免疫原性評価法の開発と標準化

#### C-2.4.1. Drug tolerance 改善法の開発と標準化

抗薬物抗体(ADA)は、infusion reaction等の有害反応や有効性低下につながることから、バイオ医薬品の安全性を阻害する要因の一つとなり得る。ADAの測定では、投与後の薬物が血清試料中に残存し、ADA検出を妨害することが問題となっている。

Drug tolerance 改善のための分析法を開発し、Drug tolerance 改善法の測定プラットフォームでの有用性の比較を行うために、4機関による共同研究を行なった。4機関で使用された分析法は、機関Aは、LOCI法、それ以外の機関はECL法である。Drug tolerance は、共存薬物存在下でのADA測定により、仮カットポイント(CP)を用いたDrug tolerance limit (DTL)を評価した。

Drug tolerance改善法として、全機関で酸解離法(試料に酸を加え、ADA-薬物結合体を分離後、中和し、ADAを測定する方法)が検討された。機関Dではさらに、酸によるADAの変性・失活の可能性を懸念して、酸解離を行わず、標識薬物濃度、インキュベーション時間と温度の3条件を最適化することにより、共存薬物と標識薬物の置換を促

す方法(平衡移動)によるDrug tolerance改善が試みられた。

各機関で最適化した条件で分析した結果の代表例として、B-mAb共存下で抗B-mAb抗体を測定した結果を表12に示す。表12の測定値は、duplicateまたはtriplicateでの平均値で、網掛けした数値が、仮CPから陽性と判断された数値である。

抗B-mAb抗体は、酸解離により、すべてのADA濃度でDrug toleranceが改善した(機関A~D)。また機関Dでは、標識薬物濃度を2倍にし、標識薬物とのインキュベーション時間を2hrから48hrに延長かつインキュベーション温度を室温から37°Cに変更することによって、Drug toleranceが改善した。両法ともADA濃度が低いほうが、改善効果が大きかった。

各機関の測定値をGraphPad Prism 5Jを用いて、4-パラメータロジスティック回帰し、得られた曲線に仮CPを内挿してDrug tolerance limit (DTL)を算出し、改善法あり/改善法なしのDTL比を算出した結果を表13に示した。シグナルが仮CPを下回らない等の理由で、DTLが算出できないものについては、改善効果をグラフから判断した。

ほとんどのモデルADAでDrug tolerance改善効果を得ることが確認できたが、3機関で測定を実施した抗EPO抗体BM802については、機関Aでは酸解離により、レスポンスが低下し、Drug toleranceも改善されなかった。機関Dでは、酸解離法でも平衡移動法(標識薬物とのインキュベーション時間を2hrから48hrに延長かつインキュベーション温度を室温から37°Cに変更)でも改善がみられなかった。機関Bでは、わずかに改善されたが、ADAの特性によっては、今回設定された条件においても、十分なDrug tolerance改善効果が得られない場合があると考えられた。

#### C-2.4.2. 抗EPO抗体国際標準品の共同検定

WHOより配布された抗EPOヒトモノクローナル抗体10種について、SPR法、及び、LOCI法で、カットポイントをまたぐ希釈倍率を測定した。カットポイントは、50検体の個別血清の測定値から5%

偽陽性を許容するレベルとして設定した。

## C-2.5. バイオ医薬品の安全性の分析・評価法研究

抗体医薬品の有害事象のうち、infusion reaction、心不全、及び、穿孔についてリスク因子を検討するため、初回発現時期の解析や年齢・性別・適用理由等に関する粗オッズ比の計算を行った。初回発現時期や粗オッズ比の計算から、インフリキシマブでは30代または乾癬、セツキシマブ及びリツキシマブでは60代以上、トラスツズマブでは男性または胃癌、トシリズマブでは10代以下がinfusion reactionのリスク因子である可能性が示唆された。なお、セツキシマブ・インフリキシマブ及びリツキシマブのinfusion reaction報告症例における抗ヒスタミン剤の併用割合は、全有害事象報告症例で見た時よりも高かった。その他、トラスツズマブ及びベバシズマブでは女性または乳癌、トシリズマブ及びエタネルセプトでは60代以上、インフリキシマブではベーチェット症候群が心不全のリスク因子である可能性が示唆され、ベバシズマブでは遠隔転移を伴う結腸癌・直腸癌、インフリキシマブでは男性またはクローン病、リツキシマブでは60代以上またはびまん性大細胞型リンパ腫が穿孔のリスク因子である可能性も示唆された。

## C-2.6. 新規ウイルス安全性評価技術の開発

### C-2.6.1. CHO細胞内在性レトロウイルス様粒子の解析

バイオ医薬品製造に頻用されているCHO細胞では、非感染性内在性レトロウイルス様粒子が産生されていることが知られている。CHO細胞ゲノムには数百に上る内在性ウイルスゲノムが散在するため、ウイルス様粒子をコードしている遺伝子を特定することは未だにできておらず、簡便なウイルス粒子数の測定系もない。そこで、CHO細胞ゲノムデータ等を使ってCHO細胞から産生されるウイルス様粒子をコードしている内在性レトロウイルス遺伝子を特定することにした。

チャイニーズハムスターの転写産物のデータ

ベースをダウンロードし、感染複製能力のあるレトロウイルスのGagタンパク質を保持している遺伝子を検索した。その中からORFが残っている可能性のあるgag遺伝子を絞り込んだ。このうちgag ORFの全長を保持している遺伝子は4つ見つかったが、gag遺伝子全長に渡って発現が見られたのはChERV-050801のみであった。また従来までCHO細胞でウイルス様粒子産生に関係していると考えられてきたCHIAP34やMG-2Lは、全く発現していなかった。さらにこれを確認するために、CHO細胞上清からウイルス様粒子を超遠心によって濃縮し、シヨ糖密度勾配遠心法でウイルス様粒子を精製したところChERV-50801のみが検出された。またウエスタンブロット解析によってGagタンパク質解析したところ細胞外に放出されたウイルス粒子はウイルス自身のPro（プロテアーゼ）によって切断されていなかった。

### C-2.6.2. Q-PCRによるウイルスクリアランス試験

ウイルスクリアランス試験にQ-PCRを用いる場合、ウイルスゲノム断片の残存等が原因となり、感染価とQ-PCRによるウイルスゲノム量の相関性が得られない場合がある。そこで、生体由来材料に混入リスクが報告されているヒトパルボウイルスB19（B19）を材料に、ウイルス除去膜の工程処理前後における感染価及びQ-PCRによるゲノム量の変化を解析し、工程のウイルス除去率評価に応用可能なQ-PCRの条件について課題と対応策を明らかにした。

ビリオン（ウイルス粒子）を試料とした場合、50 U/mLのDNase I及び10 U/mLのMicrococcal Nuclease処理でややゲノムの減少傾向が認められたが、その他の条件ではゲノム濃度の低下は認められなかった。一方、遊離ゲノムを試料とした場合、Nucleaseの濃度及び反応時間依存的にゲノム濃度の低下が認められた。そこでビリオン中ゲノムが減少せず、遊離ゲノムが検出限界未満となる条件の内、反応時間が最短であったMicrococcal Nuclease 2 U/mL、30分の反応をサンプル処理条

件として設定した。

ウイルス除去ろ過膜処理前後の試料について、感染価を評価したところ、分取したろ過後液はいずれも検出限界未満となったが、Log Reduction Value (LRV) は、2回のrunで $\geq 2.20$ ,  $\geq 2.00$ といずれも低かった。また、対照となるろ過前サンプルを24℃又は5℃で静置したサンプルでも感染価の低下が認められたことから、得られたLRVがウイルスの除去によるものか、不活化によるものかの判別は困難であった。一方、988 bp Q-PCRによる測定では、Nuclease<sup>-</sup>ではLRVが2.04~2.56であったのに対して、Nuclease<sup>+</sup>ではろ過前サンプルの値は殆ど低下せず、ろ過後サンプルでは大きく低下し検出限界未満となり、LRV値は $\geq 5.03$  (Run 1),  $\geq 5.26$  (Run2)となった(表17)。988 bp Q-PCRではNuclease<sup>-</sup>, +ともに対照となるろ過前サンプルの値の低下は認められなかった。

### C-3核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発 (Ⅲグループ)

#### C-3.1. スプライシング制御型アンチセンスのハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果に関する研究

ジストロフィン遺伝子・エクソン58に対して140本のアンチセンスをデザイン・合成し、それぞれをRD細胞に導入して、エクソン58のスキップ活性を調べた。この結果、今回スクリーニング条件(アンチセンス濃度:100nM, リポフェクション法)では、59本のアンチセンスにおいて、80%以上のスキップ活性が認められた(=成熟mRNAの80%以上でエクソンスキップが観察された)。複数の定量解析を総合的に判断し、高いエクソンスキップ活性を有するアンチセンスとして34本選別した。次にこれらのアンチセンスについて、*in silico*解析を行い、「できるだけ多くのヒト遺伝子と相補結合するアンチセンス」を3本選別した。ヒットするmRNAが多いほど、アレイ解析から得られるオフターゲット効果に関する情報も多くなると期待される。以上の解析から得られたアンチ

センスは「高いエクソンスキップ活性を有し、かつ、ヒト遺伝子にできるだけヒットする18塩基長のスプライシング制御型アンチセンス」である。我々はこのアンチセンスの1つをsplice-switching oligonucleotides 18-2(SSO18-2)と命名し、以降のオフターゲット効果の検証を行った。

本研究の目的は、「①高密度エクソンアレイでスプライシング制御型アンチセンスのオフターゲット効果を評価できるのか検証を行うこと」、「②オフターゲット効果が起こる配列条件を明らかにすること」であるので、オフターゲット効果ができるだけ観察されやすいと思われる条件を選定した。すなわち、できるだけ高濃度のアンチセンスを導入し、かつ、細胞毒性がみられない濃度(細胞生存率80%以上)として、最終的にED<sub>50</sub>の10倍(2.76×10 = 27.6 nM)の濃度を設定し、オフターゲット効果の検証を行った。「ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果あり」と判断するための線引きについては、ここでは便宜的に「コントロールと比較して当該エクソンの発現量が50%未満に減少した場合」と定義する。

SSO18-2をRD細胞に導入した後、24時間後にtotal RNAを抽出し、高密度エクソンアレイで各遺伝子のエクソン毎の発現変動を解析した(試行回数n=4)。高密度エクソンアレイにおいて、ジストロフィン遺伝子エクソン58の発現は十分に確認されなかったため(コントロール群の4検体のうち、「発現あり」を示すPresent判定は1検体のみ)、オンターゲット効果は上述のRT-PCRで確認した。エクソン58の発現が十分に観察されなかった要因としては、①RD細胞におけるジストロフィン遺伝子の発現量が他の遺伝子と比較して相対的に少ない(PCR系では増幅できるが、ハイブリダイゼーションの原理では検出が難しい)、②ジストロフィン遺伝子エクソン58に設定されたプローブセットの検出感度が十分ではない等の理由が考えられる。

次に、前述の「オフターゲット候補エクソンの抽出および分類」でグループ分けした各オフター

ゲット候補エクソン群について、遺伝子発現変動を解析した。SS018-2とオフターゲット候補エクソンの相補結合におけるミスマッチ、デリション、インサクションを区別することなく、同じ「不適合性 (incompatibility: inc)」というパラメータで不適合箇所をカウントし、その総数でオフターゲット候補エクソンを分類した。SS018-2と相補性のないエクソンが50%未満に発現抑制される割合は0.09%であるのに対し、SS018-2と2箇所 (inc 2), 3箇所 (inc 3), 4箇所 (inc 4) の不適合性があるエクソンではそれぞれ10.0%, 2.75%, 0.51%であった。すなわち「50%未満に減少するエクソンの割合」はオフターゲット効果の概念から予測されるように、相補性の程度と完全に相関していた。また、発現抑制の程度を加味して解析を行うと、不適合箇所が2~3箇所のオフターゲット候補エクソン (inc 2, inc 3) は明確にオフターゲット効果の影響を受けていることがわかった。なお、不適合性0 (完全相補: inc 0) および不適合性1 (inc 1) のエクソンは存在しなかった。以上の結果から、スプライシング制御型アンチセンスによりハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果が実際に引き起こされることが初めて明らかとなった。また、この結果は、スプライシング制御型アンチセンスのオフターゲット効果の評価法として、高密度エクソンアレイが有用であることを示している。

### C-3. 2. スプライシング制御型アンチセンスの自然免疫活性化に関する研究

ODN2006の配列を短縮した計6種類のオリゴ核酸を合成し、そのTLR9活性化能を調べた。それぞれのオリゴ核酸の名称は「塩基長 - アルファベット」で表記し、例えば「18a」であれば、ODN2006を18塩基長に短縮したオリゴ核酸の1つであることを示している。短縮したそれぞれのオリゴ核酸を終濃度5 $\mu$ MでHEK-Blue hTLR9細胞に添加したところ、18塩基長の18aオリゴおよび18cオリゴではODN2006と同等のTLR9活性が保持されたが、他の2本 (18bオリゴ, 18dオリゴ) は約60%までT

LR9活性が減弱した。また、15塩基長に短縮したオリゴ配列 (15aオリゴ, 15bオリゴ) に関してもTLR9活性はODN2006と比較して約60%まで減弱しており、ODN2006と同等のTLR9活性は認められなかった。以上の解析から、ODN2006と同等のTLR9活性化能を有する18塩基長のオリゴ配列として、18aオリゴと18cオリゴの2つを同定することができた。

次に得られた18塩基長の配列に対し、修飾型核酸の導入を検討した。TLR9活性が保持された18aオリゴと18cオリゴについて、CpGジヌクレオチドの数を比較すると、18aが3カ所、18cが2カ所であった。修飾型核酸の導入による活性変化の考察をシンプルにするため、今回はCpGジヌクレオチドの数が少ない18cオリゴを改変対象に選んだ。18cオリゴに2'-OMe (糖部の2'位を修飾した核酸) やLNA (糖部架橋型核酸) 等の修飾型核酸を導入したオリゴ核酸を合成し、HEK-Blue hTLR9細胞に添加したところ、今回解析した修飾型核酸の多くについて、TLR9刺激性オリゴ核酸のTLR9活性化能を顕著に抑制する効果があることを見出した。

## C-4 天然物医薬品の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発 (IVグループ)

### C-4. 1. 単味生薬製剤の品質確保に関する研究

単味生薬エキスと煎剤の同等性確保のためのブリッジングガイドライン (案) では、標準煎剤と生薬エキスの指標成分定量値の比較を少なくとも2成分について行い、それらの同等性を担保することとしている。昨年度に続き、さらに14生薬 (ウワウルシ, カゴソウ, キキョウ, ケツメイシ, ゲンチアナ, ゲンノショウコ, サンキライ, シャゼンソウ, センナ, センブリ, ダイオウ, ニンジン, ボウイ, マクリ) について指標成分を選定したうえで確認試験と定量法について実証試験を行ったところ、いずれも概ね妥当性があるものと判断された。

### C-4. 2. 西洋ハーブの品質確保に関する研究

チェストツリー及びマンケイシの果実について

て、LC/MS測定とピーク抽出を行い、6,508のピークを得た。次に、チェストツリーとマンケイシの判別分析 (OPLS/O2PLS-DA) を行った結果、両者は、それぞれのグループに明瞭に区別可能であった。二群間におけるピーク強度を比較した結果、チェストツリーには全く含まれず、マンケイシにのみ含まれるピーク7つのうち、天然物として不自然ではない組成式を有する化合物をマンケイシの指標成分候補として見出した。

マンケイシをクロロホルムで抽出後、シリカゲルカラムクロマト、逆相カラムクロマト、及びCHP-20を用いたカラムクロマトにより分離し、最終的には逆相HPLCで繰り返し分離精製を行ない、目的化合物を単離した。本化合物は無色非晶形物質で得られ、TOF-MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT, HMQCスペクトルの解析により、3-*O*-*trans*-feruloyl tormentic acidと同定された。

#### C-4. 3. 標準煎剤とエキスとの同等性確保研究

センブリを材料として選択し、各国薬局方及びそれに準ずる基準等を調査した結果、指標となりえる化合物としてスウェルチアマリンの他に、CPに規定のあるスウェロシド (sweroside) 並びにセンブリの成分として報告されているゲンチオピクロシド (gentiopicroside) が考えられた。これらのうち定量に際して妨害ピークが少ないと考えられ、より超波長側に極大吸収を持つゲンチオピクロシドを第2の指標成分とすることとした。

日局「センブリ」より煎じ液及びそのエキスを調製し、確認試験及び定量法の可用性を検証したところ、いずれも良好な結果を与え、スウェルチアマリン及びゲンチオピクロシドに関する試験項目がほぼ確立された。

#### C-4. 4. 国内流通の葉類生薬ハッカに関する調査

ハッカに関する文献調査の結果、最近出版された “Mint” The genus *Mentha* (Edited by Brian M. Lawrence, Taylor & Francis Group LLC, 2007) によれば、植物分類学的には、日本薬局方

にハッカの基原として記載されている *Mentha arvensis* Linné var. *piperascens* Malinvaud という学名は *M. canadensis* L. に書き換えられていることが分かった。

収集したハッカはすべて乾燥品であり、産地によって茎部分が紫色のものとそうでないものがあったり、葉の厚みが異なっていたりする違いはあったが、腺鱗の様子や腺毛などについて、大きく異なるサンプルは見当たらなかった。即ち、通常の形態観察から、基原の種が異なっていると予想されるようなサンプルはなかった。

#### C-4. 5. マオウエキスの成分プロファイル分析

エフェドラアルカロイド除去マオウ (EFM) の製造に用いたマオウエキスと活性評価に用いたマオウエキスをLTQ-orbitrap型LC/MSで分析し、これらのピークはPDA (254 nm), TIC 共によく一致したことから、各マオウエキスは同等であることが明らかになった。また、エフェドリンアルカロイドの他に、4つのピークがEFMにおいて消失もしくは減少していることが分かり、このうち3つは既知の6-methoxykynurenic acid, 6-hydroxykynurenic acid 及び6-methoxykynurenic acidであった。

#### C-4. 6. マオウエキスの薬理学的解析

TRPV1を強制発現させた細胞株mTRPV1/Flp-In293細胞にマオウエキスを添加後、細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を解析した。その結果、マオウエキスの添加濃度に依存して細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇が観察された。一方、TRPV1特異的阻害剤であるBCTC (4-(3-Chloro-2-pyridinyl)-N-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-1-piperazinecarboxamid)の前処理により、マオウエキスによる細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇は抑制された。以上の結果より、マオウは、TRPV1を介した $\text{Ca}^{2+}$ の流入を惹起する作用を有することが明らかとなった。また、マオウエキスに対して、マウスを用いたインビボ疼痛試験のひとつであるPaw licking試験を実施したところ、投与量依存的に疼痛行関連行動時間が増加した。また、マオウエキスによるPaw licking時間は、TRPV1特異的阻

害剤であるBCTCの同時投与によって抑制された。以上の結果より、マオウは感覚神経に発現しているTRPV1を介した疼痛を誘発することが明らかとなった。

次に、マオウがTRPV1の脱感作を介した鎮痛作用を有するのかどうかを、カプサイシンによるPaw licking試験を用いて解析した結果、マオウはTRPV1の脱感作を介して鎮痛作用を発現することが示唆された。

#### C-4.7. ゲノム解析による原料生薬の品質評価

ボウフウ類生薬として入手したものについてITS

領域の塩基配列を解析したところ、少なからぬ検体がボウフウではなく、華山前胡であった。ボウフウの純度試験を設ける目的で、ボウフウ及び華山前胡のITS領域の塩基配列の多重整列解析を行い、ARMS法のターゲットとして適切な部位を見出し、特異的なプライマーを設定した。1%疑似混合試料あるいは5%疑似混合試料を含む検体でも華山前胡由来のPCR産物を検出することが可能であり、また、陽性対象プライマーによるPCRも、特に問題が見られなかった。

ジンギョウについては、Cruciata節9種のITS1、5.8S、及びITS2領域の塩基配列を比較しところ、若干の種内多型が認められるものの、各種に特徴的な配列が認められた。

#### C-4.8. 多変量解析による原料生薬の品質評価

ショウキョウ及びカンキョウのエキスについて、LC-HRMS分析を行い、各検体から得られたデータをアライメントし、様々な条件でピーク抽出した後、主成分分析を行った。ショウキョウ由来の試料は、全て第一主成分（Factor 1）が正、第二主成分が負の値を示し、一定の範囲内に区分された。カンキョウ由来の試料は、全て第一主成分が、負の値を示した。従って、第一主成分の正負により、ショウキョウとカンキョウは、区別された。

## D. 考察

### D-1 医薬品品質管理手法の高度化に対応した

## 医薬品製剤の評価技術の開発(Iグループ)

### D-1.1. 先端的DDS製剤の製剤機能評価手法研究

先端的DDS製剤の重要品質特性の特定、製剤機能評価手法の構築により、製品としての品質基準の明確化、品質確保方策の確立につながると考えられる。

本年度は、PEG-ポリアミノ酸ブロック共重合体とMAPの8分岐型Lysデンドリマーを基本骨格とする2種類の合成リガンドプラットフォームを構築した。今後は、ペプチド等の標的特異性を有するリガンド分子や蛍光色素等のプローブ分子を導入することによって、培養細胞を用いた合成リガンドの機能評価法を構築するとともに、がん細胞の皮下移植モデルを用いてがん集積量、特異性の評価を行っていく予定である。

また本研究では、ポリイオンコンプレックスがタンパク質製剤のナノ粒子化に非常に有効であり、堅牢な調製方法を与える可能性が示唆され、さらに機能性を付与した汎用性の高いタンパク質製剤ナノ粒子化技術として方向性を再検討するとともに、CQAやCQAに影響する工程パラメータに関する知識を蓄積したい。

一方、種々の脂質から成るリポソームにドキソルビシンを内包した際には、その脂質組成が有効性に関連する内包率に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。本知見は、リポソーム製剤の製剤設計において有益であると考えられる。

肝薬物移行に加えて、OATP1B1がB型肝炎ウイルスの外殻蛋白との相互作用を通じて、その体内動態に関与していることが示唆された。さらに、その意義について、検証することが必要である。

### D-1.2. 先端的分析評価法を用いた製剤開発及び製造工程管理に関する研究

製剤開発における製剤特性を評価する先端的

手法として、動的散乱法を用いた粒度分布、弱塩基性化合物における食事の影響を評価可能な溶出試験、塩化合物の脱塩・フリー化の有無を予測できる脱塩判定式の作成について検討を行った。これらの検討からは良好な結果が得られたが、適用例がまだ少ないため、まだ改善の余地があると思われる。これらの評価系は製剤開発時における製剤設計の際に欠かせない情報を提供できる可能性があり、製剤開発の迅速化、効率化が望めるようになると考える。

また製造工程を管理する先端的手法として、連続製造工程におけるリスクアセスメント及び PAT を用いた連続製造工程のリアルタイムモニタリングについて検討を行った。工程中のモニタリングを行うためには、オフラインの場合と異なり、流動する粉体を測定するための対策が必要となる。近赤外による水分モニタリングの場合、測定対象物を静止させて計測する構造を導入することにより、モニタリングを可能としたが、粒度モニタリングでは配管途中に粒度分布計の測定プローブを設置したところ閉塞が生じ、プロセスに悪影響を及ぼした。そのため配管外に測定プローブを設置したが、十分な結果が得られなかったことから代表的なサンプリングがされていないと考えられた。測定部分ができるだけ多くの湿潤造粒物を測定できるような工夫が必要と考える。

テラヘルツ波等振動分光を用いた口腔内崩壊錠の品質特性評価：TDS-テラヘルツ分光器及びテラヘルツカメラを用いた検討から、当初、吸湿性の評価に用いようとした吸収は、乾燥空気のパーズ停止による雰囲気中の水蒸気が光路内に侵入したことによるものと結論付け、2 THz 付近の吸収の変化が吸湿により生じたものと推察した。この結果から、今後は 2 THz 付近の吸収の変化を中

心に吸湿との関連性を評価することが適切であると考へた。また、パーズを行わずに雰囲気環境のままバックグラウンド（リファレンスは空気）を測定した場合には、水蒸気の吸収が安定せずに正確なバックグラウンド補正が困難であった。これらのことから TDS テラヘルツ分光器を用いて吸湿性の評価を行うには光路上の水蒸気の影響を減じるように工夫が必要と考へられた。また、2 THz 付近の帯域のエネルギーが高いテラヘルツ波発振器または分光器を用いることも相対的に水蒸気の影響を減じるためには有用であり、これらの解決策も含めて次年度以降の検討課題とした。

### D-1. 3. 難水溶性薬物製剤の製剤特性の評価技術の開発

コアモルファスの形成を予測する評価手法の確立：熔融法においては、2 種の薬物を融点以上に加熱して液体状態とした後に、急冷することでコアモルファスを得るため、2 種の薬物が液体状態で混合する必要がある。混合に伴うギブズエネルギー変化 ( $\Delta G_{mix}$ ) に着目し、コアモルファス形成との関連を検討した。 $\Delta G_{mix}$  は、式 1 のように混合エンタルピー ( $\Delta H_{mix}$ ) 及び混合エントロピー ( $\Delta S_{mix}$ ) に分解して考えることができ、 $\Delta G_{mix}$  が小さいほど、すなわち  $\Delta H_{mix}$  の値が小さく、 $\Delta S_{mix}$  の値が大きいほど混合に有利に働く。

$$\Delta G_{mix} = \Delta H_{mix} - T \Delta S_{mix} \quad (\text{式 1})$$

各薬物の組み合わせにおける  $\Delta H_{mix}$  を熱力学物性推算ソフトウェア COSMOTherm(菱化システム)を用い、Conductor like Screening Model for Realistic Solvation (COSMO-RS) 法により計算し、コアモルファス形成との相関を調査したところ、 $\Delta H_{mix}$  が正の値を示す組み合わせにおいては、いずれもコアモルファスが形成されないことが明らかとなった。一方で、 $\Delta H_{mix}$  が負の値を示す場合にはコアモルファスが形成される傾向が見

られたが、コアモルファスが形成されない組み合わせも認められた。液体の混合においては、基本的にエントロピーの増大を期待できるが、疎水性相互作用様の効果が働く場合には、薬物分子の自由度が低下し、エントロピーが減少すると考えられる。疎水性相互作用様の効果は、薬物の Log P 値の乖離が大きいほど強く働く傾向があると考えられるため、各薬物の組み合わせにおける Log P 値の差 ( $\Delta \text{Log P}$ ) を計算し、コアモルファス形成との相関を調査した。今回検討した薬物の組み合わせにおいて、 $\Delta \text{Log P}$  が大きい場合には、 $\Delta H_{\text{mix}}$  が負であってもコアモルファスが形成されないことが確認された。 $\Delta H_{\text{mix}}$  と  $\Delta \text{Log P}$  がコアモルファスの形成の重要な因子であることが示された。

非晶質の安定性を予測する評価手法の確立：本実験の結果から、同じ薬物の組み合わせにおいても、コアモルファス形成による物理的安定性の改善には、異種分子間で形成される相互作用が寄与していると推察される。この相互作用は  $\Delta H_{\text{mix}}$  に反映されると考えられるため、各モル比でインドメタシン及びフェロジピンを混合させた際の  $\Delta H_{\text{mix}}$  を計算し、物理的安定性に及ぼす影響を調査した。インドメタシン及びフェロジピンの  $\Delta H_{\text{mix}}$  は、モル比 1:1 で極小値をとり、この比率から離れるほど増加することが明らかとなった。 $\Delta H_{\text{mix}}$  とコアモルファスの物理的安定性を比較したところ、 $\Delta H_{\text{mix}}$  の小さなモル比のコアモルファスほど高い安定性を示す傾向が認められた。一方で、インドメタシン：フェロジピン = 5:1 及び 1:3 の比率においては、 $\Delta H_{\text{mix}} = -0.334 \text{ kcal/mol}$  及び  $-0.359 \text{ kcal/mol}$  とほぼ等しい値を示すにも関わらず、インドメタシン：フェロジピン = 5:1 の比率のコアモルファスの方が、より安定であった。非晶質インドメタシンは非晶質フェロジピン

よりも優れた安定性を示す。よって、インドメタシン：フェロジピン = 5:1 の非晶質は、非晶質状態での安定性が高いインドメタシンの割合が多いことにより、モル比 1:3 の非晶質よりも安定であったと推察された。以上の結果より、非晶質の物理的安定性には、 $\Delta H_{\text{mix}}$  及び薬物単体の非晶質の安定性が寄与することが示唆された。

非晶質の吸湿性評価：薬物単体の非晶質の水分含量から、物理混合物の推定水分含量を計算し、同じ組み合わせの薬物からなるコアモルファスの水分含量と比較したところ、ほとんどの場合において、コアモルファスの方が低い水分含量を示すことが明らかとなった。

ニフェジピンとニコチン酸アミドのコアモルファスの保存安定性と分子運動性の関連：DSC 測定と PXRD パターンの解析より、ニコチン酸アミドとのコアモルファス化により、非晶質ニフェジピンの物理的な保存安定性が向上していることが判明し、コアモルファスの結晶化速度には、非晶質マトリクスの分子運動性が大きく影響していることが分かった。また、結晶加速度と分子運動性の関連を検討するため、非晶質ニフェジピンについては分子運動性の指標としてエンタルピー緩和時間を測定した。一方、エンタルピー緩和時間は  $T_g$  以上の温度では実験的に測定できないため、 $T_g$  が  $25^\circ\text{C}$  より低いモル比 1:1 のコアモルファスの分子運動性はフラジリティパラメータ等の値から Vogel-Tammann-Fulcher (VTF) 式および Adam-Gibbs-Vogel (AGV) 式を用いて緩和時間を算出した。 $15^\circ\text{C}$  におけるモル比 1:1 のコアモルファスの緩和時間は非晶質ニフェジピンの緩和時間の 5 倍の値であり、非晶質ニフェジピンに比べ分子運動性が低いことが示された。しかし、コアモルファスの緩和時間は  $T_g$  (約  $18^\circ\text{C}$ ) 以上の温度において急激に減少し、 $40^\circ\text{C}$  においては非晶質ニフ